

JIMR - Journal of Islamic Medicine Research
Published by Faculty of Medicine, Universitas Islam Malang
Email: jimr@unisma.ac.id
Home Page : <http://riset.unisma.ac.id/index.php/fk>

E-ISSN: 2580 927X
Pages: 55 – 64

Pengaruh Pemberian secara Subkronik Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) dan *High Density Lipoprotein* (HDL) Serum Tikus Wistar

Yunita Ika Pratiwi*, Sasi Purwanti**, Dini Sri Damayanti**

*Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

**Staf Pengajar Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang

Email: yunitajuni04@yahoo.co.id

ABSTRAK

Pendahuluan: Minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) memiliki kandungan senyawa terpenoid, alkaloid, dan fenolik. Terpenoid, alkaloid, dan fenolik berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi dalam dosis yang tepat. Apabila dosis penggunaan tinggi dan dalam waktu yang lama, maka terpenoid, alkaloid, dan fenolik akan berubah menjadi toksik dan mengakibatkan peningkatan LDL dan penurunan HDL. Tujuan penelitian ini adalah mengetahui keamanan pemberian minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap kadar LDL dan HDL serum tikus wistar secara subkronik.

Metode: Penelitian eksperimental laboratorium dengan desain *control group post test only* secara *in vivo* menggunakan 20 tikus wistar jantan dan 20 tikus wistar betina yang terbagi menjadi 8 kelompok, yaitu kelompok jantan dan betina KN (tween 80), P1 (minyak atsiri 1,25 mg/kgBB), P2 (minyak atsiri 2,5 mg/kgBB), dan P3 (minyak atsiri 5 mg/kgBB). Penelitian dilakukan selama 28 hari kemudian dilanjutkan dengan pemeriksaan kadar LDL dan HDL serum. Hasil dianalisa menggunakan uji *One Way ANOVA* yang dilanjutkan *Least Significant Difference* (LSD). Hasil dikatakan bermakna jika $p < 0,05$.

Hasil dan Pembahasan: Pemberian minyak atsiri daun sirsak secara subkronik pada kelompok jantan dan betina P1 menunjukkan nilai kadar LDL paling tinggi dan semakin tinggi dosis menunjukkan penurunan kadar LDL. Kelompok P2 menunjukkan nilai kadar HDL paling tinggi dan kelompok P3 mengalami penurunan kadar HDL dibandingkan P2. Peningkatan kadar LDL dan penurunan kadar HDL pada kelompok perlakuan diduga karena adanya senyawa aktif minyak atsiri daun sirsak, perbedaan berat badan dan perbedaan konsumsi makan pada hewan coba.

Kesimpulan: Dosis 2,5 mg/kgBB merupakan dosis aman, yang tidak meningkatkan kadar LDL dan menurunkan kadar HDL secara subkronik pada tikus jantan dan betina normal.

Kata Kunci: Minyak atsiri daun sirsak, *Annona muricata* Linn., Subkronik, LDL, dan HDL.

The Subchronic Effect Soursop (*Annona muricata* Linn.) Leaf Essential Oil on LDL and HDL Levels in Wistar Rats

Yunita Ika Pratiwi*, Sasi Purwanti**, Dini Sri Damayanti**

*Student of the Faculty of Medicine, Malang Islamic University

**Lectures of the Faculty of Medicine, Malang Islamic University

Email: yunitajuni04@yahoo.co.id

ABSTRACT

Introduction: The essential oil of soursop (*Annona muricata* Linn.) leaves contains terpenoid, alkaloid, and phenolic compounds. Terpenoid, alkaloid and phenolic function as antioxidants and antiinflammatory agents appropriately. When used in high concentrations and in long period, it may become toxic, which may increase in LDL and decrease in HDL. The study is to determine the safety of soursop leaf essential oil on LDL and HDL levels in wistar rats.

Methods: This was an *in vivo* experimental study with a control group post test only design using 20 male and 20 female wistar rats divided into 8 groups, consisting of KN (tween 80), P1 (1,25 mg/kgBW), P2 (2,5 mg/kgBW), and P3 (5 mg/kgBW) both male and female rats. This study was conducted for 28 days then the LDL and HDL levels were checked after the treatment. Results were analyzed using *One Way ANOVA* test followed by *Least Significant Difference* (LSD). Results are assumed significant if $p < 0,05$.

Results and discussion: Administration of soursop leaf essential oil in P1 group showed the highest LDL levels and a higher dose of soursop leaf essential oil will cause a lower LDL levels in both male and female groups. The P2 group showed the highest HDL levels and P3 group had decreased HDL levels compared to P2 group in both male and female groups. The increasing of LDL levels and the decreasing of HDL levels in all treatment groups, is suspected to be caused by active compounds in soursop leaf essential oil, body weight differences and food consumption differences on rats.

Conclusion: The doses between 1,25 to 5 mg/kgBW is considered to be safe, in which no increase in LDL and decrease in HDL in normal male and female rats was observed.

Keywords: Essential oil of soursop leaves, *Annona muricata* Linn., Subchronic, LDL, and HDL.

PENDAHULUAN

Data *World Health Organization* (WHO) tahun 2013 memperkirakan 80% penduduk dunia masih menggunakan tanaman obat¹. Beberapa tanaman obat berdasarkan mekanismenya dapat memiliki efek toksik. Oleh sebab itu, penelitian tentang keamanan tanaman obat perlu dilakukan. Salah satu tanaman obat yang sering digunakan di Indonesia adalah daun sirsak (*Annona muricata* Linn.)².

Daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) dalam bentuk minyak atsiri mengandung senyawa terpenoid (81,79%), alkaloid (9,36%) dan fenolik (8,85%). Penelitian Moses *et al.* tahun 2013 juga menyatakan komponen terbesar minyak atsiri daun sirsak adalah senyawa turunan terpenoid, sedangkan penelitian Sawant dan Dongre tahun 2014 juga mendapatkan adanya senyawa alkaloid dalam kandungan minyak atsiri daun sirsak. Terpenoid, alkaloid, dan fenolik memiliki manfaat sebagai antioksidan dan antiinflamasi dalam dosis yang tepat. Apabila konsentrasi penggunaan tinggi dan dalam waktu yang lama maka akan berubah menjadi toksik dan memicu kerusakan hepar^{5,6}. Kerusakan hepar yang terjadi akan mengganggu fungsi metabolisme lipoprotein sehingga terjadi peningkatan kadar LDL dan penurunan kadar HDL serum^{5,6,7}.

Penelitian uji toksisitas oleh Arthur *et al.* tahun 2011 menyatakan bahwa pemberian subkronik daun *Annona muricata* selama 14 hari pada tikus jantan dan betina dengan dosis 2500 mg/kgBB secara oral tidak meningkatkan kadar SGOT, SGPT, ALP, kolesterol total dan LDL, namun terjadi penurunan kadar HDL pada tikus betina dengan dosis 1000 mg/kgBB⁸. Uji pendahuluan toksisitas akut pada mencit jantan tidak mendapatkan nilai LD₅₀ namun tampak pada dosis 1,25, 2,5, dan 5 mg/kgBB terdapat perubahan klinis sesuai kriteria Loomis (1978).

Oleh karena itu, peneliti ingin mengetahui keamanan pemberian minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap fungsi hepar melalui pengukuran kadar LDL dan HDL serum tikus jantan dan betina normal secara subkronik.

METODE PENELITIAN

Desain, Tempat, dan Waktu Penelitian

Jenis penelitian adalah penelitian laboratorium dengan menggunakan desain *control group post test only* secara *in vivo*. Penelitian telah dilakukan di Laboratorium Patologi Klinik Fakultas Kedokteran dan Laboratorium Jurusan Kimia Universitas Brawijaya, Laboratorium Putra Indonesia Malang, Laboratorium Biomedik Fakultas Kedokteran Universitas Muhammadiyah Malang, dan

Laboratorium Biokimia Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang pada bulan Maret – April 2017.

Subjek Penelitian

Subjek penelitian berupa tikus wistar putih (*Rattus novergicus*) berjenis kelamin jantan dan betina, berusia 11-16 minggu dengan berat badan 100-200 gram dan memiliki kondisi sehat. Sampel yang digunakan sejumlah 40 ekor (20 ekor jantan dan 20 ekor betina) yang dibagi dalam 8 kelompok yang dilakukan secara acak, yaitu kelompok kontrol negatif (KN) diberi tween 80, kelompok perlakuan 1 (P1) diberi minyak atsiri 1,25 mg/kgBB, perlakuan 2 (P2) diberi minyak atsiri 2,5 mg/kgBB, dan perlakuan 3 (P3) diberi minyak atsiri 5 mg/kgBB. Setiap kelompok berisi 5 ekor tikus yang kemudian dilakukan aklimatisasi hewan coba selama 7 hari di laboratorium.

Tikus wistar ditempatkan di dalam kandang dengan kondisi ventilasi yang cukup dan berisi satu ekor tikus tiap kandangnya. Tikus kemudian diberi makan dan minum sesuai standar laboratorium.

Ethical clearance

Penelitian ini telah mendapatkan persetujuan dari Komisi Etik Penelitian Universitas Brawijaya dengan nomor sertifikat No.662-KEP-UB pada tahun 2016.

Pembuatan Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Minyak atsiri daun sirsak dibuat dari daun sirsak yang diperoleh dari UPT Materia Medika Batu yang telah tersertifikasi 074/246/101.8/2016.

Pembuatan minyak atsiri daun sirsak menggunakan metode destilasi uap air. Daun sirsak kering diiris-iris dan dimasukkan ke dalam ketel alat destilasi. Ketel suling dirangkai dengan kondensor. Ketel uap kemudian dipanaskan hingga tekanan 1 atm. Uap yang dihasilkan disalurkan melalui selang yang sudah terhubung dengan ketel suling. Air dialirkan pada kondensor dan dijaga agar air terus mengalir, sehingga minyak yang menguap semuanya terembunkan dan tidak lepas ke udara. Destilat yang diperoleh merupakan campuran minyak dengan air yang selanjutnya dipisahkan dalam corong pisah, kemudian destilat ditambahkan n-hexana sebagai pengikat minyak. Proses selanjutnya yaitu evaporasi pada suhu 45°C untuk menguapkan n-hexana. Hasilnya adalah minyak atsiri murni.

Pembuatan Suspensi Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Minyak atsiri daun sirsak dengan dosis 1,25 mg/kgBB, 2,5 mg/kgBB dan 5 mg/kgBB diperoleh dari rumus $V1M1=V2M2$. Hasil minyak atsiri

murni dilakukan pengenceran dalam tween 80 dan aquades hingga 50 ml⁹.

Pemberian minyak atsiri daun sirsak 1,25 mg/kgBB, 2,5 mg/kgBB dan 5 mg/kgBB dilakukan secara personde sebesar 1 ml kepada kelompok jantan dan betina P1, P2, dan P3 setiap hari selama 28 hari.

Pengambilan Sampel Hewan Coba

Pembedahan hewan coba diawali dengan injeksi ketamin (50 mg/kgBB), kemudian tikus dibedah secara vertikal mengikuti linea mediana dari abdomen menuju ke thorak sampai seluruhnya terbuka. Pengambilan darah dari jantung sejumlah 3-5 ml dengan cara aspirasi menggunakan spuit secara perlahan dan diletakkan dalam tabung spesimen darah non-EDTA. Darah disentrifugasi dengan kecepatan 3000 rpm selama 10-15 menit hingga darah dan serum terpisah, kemudian serum dimasukkan ke dalam tabung reaksi^{10,11}.

Pemeriksaan Kadar LDL Serum

Pengukuran kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) menggunakan alat *automatic biochemistry analyzer* Horiba-Medical ABX Pentra C200. Hasil absorbansi sampel dan standar diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang λ 550 nm¹⁰.

Pemeriksaan Kadar HDL Serum

Pengukuran kadar *High Density Lipoprotein* (HDL) menggunakan alat dan instrumen *semi-automatic chemistry analyzer* BioSystem BTS-350. Hasil absorbansi sampel dan standar diukur dengan spektrofotometer pada panjang gelombang λ 500 nm¹¹.

Analisa Data

Data hasil penelitian diuji normalitas dan homogenitas secara berturut-turut menggunakan uji *Kolmogorov-Smirnov* dan uji *Levene*. Apabila data telah terdistribusi normal dan homogen, dilakukan analisa data menggunakan uji *One Way ANOVA* untuk menguji hipotesis dosis pada jantan dan betina. Apabila terdapat perbedaan yang bermakna, dilanjutkan dengan *post hoc test* menggunakan *Least Significant Difference* (LSD) untuk mengetahui perbedaan antar kelompok dosis. Hasil dikatakan bermakna bila $p < 0,05$. Uji statistik dilakukan secara komputerisasi dengan SPSS versi 20.

HASIL PENELITIAN

Karakteristik Populasi

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus wistar putih (*Rattus norvegicus*) yang memiliki karakteristik yang dapat dilihat pada tabel berikut :

Tabel 1. Karakteristik Populasi

Komponen	Kelompok							
	JKN	JP1	JP2	JP3	BKN	BP1	BP2	BP3
Jumlah sampel	5	5	5	5	5	5	5	5
Jumlah/kandang	1	1	1	1	1	1	1	1
BB awal (g)	163.7 ±10.6	185.17 ±14.4	182.6 ±9.0	166.8 ±25.9	110.3 ±19.6	125 ±17.8	119.5 ±16.7	121 ±22.0
BB akhir (g)	204.8 ±19.1	223.5 ±18.8	208.0 ±14.6	173.7 ±45.3	148.7 ±12.2	173.6 ±18.5	154.7 ±16.7	144.7 ±11.7
Sisa makan/hari (g)	6.10 ±3.52	3.07 ±8.51	5.31 ±4.74	8.04 ±1.17	8.07 ±1.37	5.16 ±2.19	7.03 ±1.82	9.13 ±0.14
Jenis kelamin	jantan	jantan	jantan	jantan	betina	betina	betina	betina
Usia awal (minggu)	11-16	11-16	11-16	11-16	11-16	11-16	11-16	11-16
Lama adaptasi (hari)	7	7	7	7	7	7	7	7
Lama perlakuan (hari)	28	28	28	28	28	28	28	28
Usia akhir (minggu)	16-21	16-21	16-21	16-21	16-21	16-21	16-21	16-21
Dosis Minyak Atsiri Daun Sirsak (mg/kgBB)	-	1,25	2,5	5	-	1,25	2,5	5
Pemberian kontrol dan perlakuan personde (ml)	1	1	1	1	1	1	1	1

Keterangan :

- J : Tikus wistar jantan
 B : Tikus wistar betina
 KN : Pemberian 0,2 ml tween 80 + aquades = 1ml
 P1 : Pemberian minyak atsiri 1,25 mg/kgBB
 P2 : Pemberian minyak atsiri 2,5 mg/kgBB
 P3 : Pemberian minyak atsiri 5 mg/kgB

Pemberian minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) hanya pada kelompok perlakuan, baik jantan dan betina. Sampel pada KN dan KP memiliki persamaan dalam hal jenis hewan coba, kriteria usia, kondisi pemeliharaan, pemberian tween 80 sebagai kontrol dan pelarut, dan cara pemberian sediaan baik pada kontrol dan perlakuan, yaitu menggunakan metode sonde lambung.

Faktor yang berpengaruh pada penelitian berdasarkan karakteristik populasi di atas adalah perbedaan berat badan, perbedaan konsumsi makanan, pemberian dosis perlakuan dan perbedaan jenis kelamin.

Kadar *Low Density Lipoprotein* (LDL) Serum Setelah Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Tabel 2. Rerata Kadar LDL Serum Tikus Wistar Jantan dan Betina

No.	Perlakuan	N	Nilai LDL Mean \pm SD (mg/dL)	
			Jantan (J)	Betina (B)
1	KN	5	8.00 \pm 3.286	7.83 \pm 2.563
2	P1	5	12.67 \pm 2.422 ^a	11.20 \pm 2.588
3	P2	5	10.60 \pm 2.074	9.50 \pm 2.345
4	P3	5	8.50 \pm 1.378 ^b	8.67 \pm 3.077

Keterangan :

KN : Pemberian 0,2 ml tween 80 + aquades = 1ml.

P1 : Pemberian minyak atsiri 1,25 mg/kgBB.

P2 : Pemberian minyak atsiri 2,5 mg/kgBB.

P3 : Pemberian minyak atsiri 5 mg/kgBB.

a : Berbeda secara signifikan terhadap JKN.

b : Berbeda secara signifikan terhadap JP1.

Hasil penelitian pada kelompok jantan menunjukkan bahwa kelompok JKN memiliki kadar LDL serum lebih rendah secara signifikan sebesar 37% terhadap kelompok JP1, tetapi tidak berbeda terhadap kelompok JP2 dan JP3. Kadar LDL serum antar perlakuan pada kelompok jantan mengalami penurunan dengan peningkatan dosis. Kelompok JP1 menunjukkan kadar LDL serum lebih tinggi secara signifikan sebesar 49% terhadap kelompok JP3, tetapi antara kelompok J1 dan JP2 serta JP2 dan JP3 tidak berbeda.

Hasil penelitian pada kelompok betina menunjukkan bahwa kelompok BKN tidak berbeda terhadap kelompok BP1, BP2, dan BP3, namun kelompok BKN cenderung memiliki kadar LDL serum lebih rendah terhadap kelompok BP1. Kadar LDL serum antar perlakuan pada kelompok betina yaitu BP1, BP2, dan BP3 tidak menunjukkan adanya perbedaan, namun cenderung mengalami penurunan kadar LDL dengan peningkatan dosis.

Kadar *High Density Lipoprotein* (HDL) Serum Setelah Pemberian Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.)

Tabel 3. Rerata Kadar HDL Serum Tikus Wistar Jantan dan Betina

No	Perlakuan	N	Nilai HDL Mean \pm SD (mg/dL)	
			Jantan (J)	Betina (B)
1	KN	5	44.17 \pm 9.218	53.00 \pm 7.099
2	P1	5	47.17 \pm 13.674	62.20 \pm 4.147 ^c
3	P2	5	59.20 \pm 9.524 ^a	68.33 \pm 7.118 ^c
4	P3	5	38.00 \pm 9.633 ^b	56.33 \pm 9.180 ^d

Keterangan :

KN : Pemberian 0,2 ml tween 80 + aquades = 1ml.

P1 : Pemberian minyak atsiri 1,25 mg/kgBB.

P2 : Pemberian minyak atsiri 2,5 mg/kgBB.

P3 : Pemberian minyak atsiri 5 mg/kgBB.

a : Berbeda secara signifikan terhadap JKN.

b : Berbeda secara signifikan terhadap JP2.

c : Berbeda secara signifikan terhadap BKN.

d : Berbeda secara signifikan terhadap BP2.

Hasil penelitian pada kelompok jantan menunjukkan bahwa kelompok JKN memiliki kadar HDL serum lebih rendah secara signifikan sebesar 25% terhadap kelompok JP2, tetapi tidak berbeda terhadap kelompok JP1 dan JP3. Kadar HDL serum antar beberapa perlakuan pada kelompok jantan menunjukkan perbedaan yang signifikan. Kelompok JP2 memiliki kadar HDL lebih tinggi secara signifikan sebesar 56% terhadap JP3, namun antara kelompok JP1 dan JP2 serta JP1 dan JP3 tidak berbeda.

Hasil penelitian pada kelompok betina menunjukkan bahwa kelompok BKN memiliki kadar HDL serum lebih rendah secara signifikan terhadap kelompok BP1 dan BP2 berturut-turut sebesar 17% dan 22% , tetapi tidak berbeda terhadap kelompok BP3. Kadar HDL serum antar beberapa perlakuan pada kelompok betina menunjukkan perbedaan yang signifikan. Kelompok BP2 memiliki kadar HDL serum lebih tinggi secara signifikan sebesar 21% terhadap kelompok BP3, namun antara kelompok BP1 dan BP2 serta BP1 dan BP3 tidak berbeda.

PEMBAHASAN

Karakteristik Populasi

Penelitian ini menggunakan hewan coba tikus wistar putih (*Rattus norvegicus*) berjenis kelamin jantan dan betina, berusia 11-16 minggu dengan berat badan sekitar 100-200 gram dalam kondisi sehat. Alasan menggunakan tikus wistar sebagai sampel dengan pertimbangan bahwa hewan ini mudah didapatkan, mudah beradaptasi dan mudah dibiakkan, mempunyai sensitifitas yang tinggi terhadap obat, lebih tahan terhadap lingkungan laboratorium, dan berbagai perlakuan¹². Tikus wistar putih juga memiliki struktur DNA yang mirip dengan manusia¹³.

Pemilihan tikus jantan dan betina pada penelitian ini untuk memenuhi ketentuan uji toksisitas subkronik *in vivo* berdasarkan BPOM tahun 2014. Pemilihan tikus normal baik jantan dan betina karena penelitian ini bertujuan untuk mengetahui pengaruh pemberian minyak atsiri daun sirsak pada kondisi normal, tanpa paparan zat perusak sebelumnya.

Pemilihan usia awal 12-16 minggu pada tikus jantan dengan pertimbangan tikus sudah mencapai usia dewasa, ukuran organ tidak terlalu kecil sehingga memudahkan pengambilan sampel, sedangkan pemilihan tikus betina usia awal 11-12 minggu dengan alasan sulit mendapatkan tikus betina usia 12-16 minggu karena tikus dengan usia tersebut sudah memasuki tahap pengkawinan¹⁵.

Berat badan dapat menggambarkan kesehatan hewan coba¹⁵. Penelitian ini menggunakan hewan coba dengan berat badan awal kisaran 100-200 gram dan terjadi peningkatan berat badan di akhir perlakuan. Penelitian minyak atsiri daun sirsak selama 28 hari menunjukkan berat badan akhir kelompok jantan dan betina perlakuan 1 merupakan angka tertinggi dan semakin tinggi dosis perlakuan menunjukkan penurunan berat badan.

Penelitian ini menggunakan hewan coba dengan jumlah minimal 32 ekor dengan masing-masing kelompok terdiri dari empat ekor tikus. Penambahan dua ekor tikus pada setiap kelompok untuk mengatasi kemungkinan adanya kematian, sehingga masing-masing kelompok terdiri dari enam ekor. Satu ekor tikus pada kelompok JP2 dan BP1 mengalami kematian, satu ekor tikus pada kelompok JKN, JP3, BKN, BP2, dan BP3 mengalami infeksi telinga serta satu ekor tikus pada kelompok JP1 mengalami infeksi mata sehingga sampel pemeriksaan yang digunakan hanya terdiri dari lima ekor tikus untuk setiap kelompok.

Tikus mengalami proses adaptasi selama tujuh hari untuk mengurangi stres sebelum perlakuan. Tikus hanya diberikan pakan dan minum setiap harinya serta penggantian sekam tiga hari sekali selama adaptasi. Penempatan satu ekor tikus untuk satu kandang bertujuan untuk menghindari bias konsumsi makan, penularan penyakit, dan perkawinan antar tikus.

Penelitian ini menggunakan Tween 80 sebagai pelarut minyak atsiri daun sirsak. Pemberian Tween 80 juga dilakukan pada kontrol negatif agar semua kelompok mendapat stressor yang sama. Pemilihan Tween 80 sebagai pelarut karena Tween 80 merupakan pelarut organik yang mampu melarutkan minyak atsiri daun sirsak yang tidak larut dalam pelarut air dan CMC¹⁶. Tween 80 termasuk dalam bahan tambahan makanan dan farmasi yang aman digunakan sesuai dengan GRAS (*Generally Recognized As Safe*). Tween 80 juga tidak menyebabkan iritasi dan memiliki tingkat toksisitas yang rendah atau bersifat *non-irritant* dan *non-toxic*¹⁷.

Pemberian minyak atsiri daun sirsak pada kelompok perlakuan 1, 2, dan 3 masing-masing sebesar 1,25 mg/kgBB, 2,5 mg/kgBB, dan 5 mg/kgBB. Dosis minyak atsiri ini merupakan dosis eksplorasi yang mengacu pada dosis uji toksisitas akut penelitian pendahuluan. Hasil penelitian uji toksisitas akut menunjukkan terjadi kematian hewan coba pada hari pertama, yaitu dua ekor pada dosis 5 mg/kgBB dan satu ekor pada dosis 7,5 mg/kgBB. Hasil penelitian juga menunjukkan perlakuan dosis 5 mg/kgBB mengalami penurunan berat badan dibandingkan kelompok kontrol negatif pada hari kedua. Peningkatan frekuensi pernafasan pada 30 menit setelah perlakuan terjadi pada dosis 2,5 mg/kgBB, sedangkan pada waktu yang sama dosis 1,25 mg/kgBB menunjukkan penurunan pernafasan. Penelitian uji toksisitas akut tidak mendapatkan nilai LD₅₀ sehingga dapat disimpulkan nilai LD₅₀ oral minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) lebih dari 7,5 mg/kgBB¹⁴.

Pemberian minyak atsiri daun sirsak menggunakan sonde lambung selama 28 hari, lamanya penelitian mengacu pada rentang waktu uji toksisitas subkronik berdasarkan ketentuan BPOM tahun 2014. Tujuan penggunaan metode sonde lambung untuk pemberian kontrol dan perlakuan agar absorpsi pada usus dapat seoptimal mungkin, tanpa adanya absorpsi di saluran pencernaan bagian atas seperti mulut dan kerongkongan¹⁸. Perlakuan sonde lambung pada kelompok kontrol negatif dan kelompok perlakuan adalah sama dimana penyondean dilakukan satu kali dalam sehari.

Penelitian ini menggunakan minyak atsiri daun sirsak yang merupakan hasil destilasi uap air dari daun sirsak. Proses destilasi uap air daun sirsak bertujuan untuk mendapatkan semua zat aktif

dalam daun sirsak yang tidak larut dalam air¹⁹. Pemilihan bentuk minyak atsiri karena sampai saat ini belum ada penelitian mengenai uji keamanan minyak atsiri daun sirsak yang sudah dipublikasikan.

Pengaruh Pemberian secara Subkronik Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Kadar Low Density Lipoprotein (LDL) Serum Tikus Wistar

Pemberian minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) pada kelompok jantan menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif memiliki kadar LDL serum lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok perlakuan dosis 1,25 mg/kgBB serta antar perlakuan menunjukkan bahwa dosis 1,25 mg/kgBB merupakan dosis tertinggi yang mengakibatkan peningkatan kadar LDL serum. Hal yang sama juga terjadi pada kelompok betina. Kelompok perlakuan dosis 1,25 mg/kgBB cenderung terlihat terjadi peningkatan kadar LDL serum lebih tinggi dibandingkan dosis perlakuan lainnya. Semua kelompok kontrol negatif dan perlakuan tampak bahwa kadar LDL serum dalam batas normal LDL tikus wistar, yaitu 7-27,2 mg/dl²⁰.

Mekanisme peningkatan kadar LDL pada pemberian minyak atsiri daun sirsak diduga diakibatkan oleh beberapa hal, yaitu akibat berat badan dan konsumsi makan yang berlebih, peningkatan biosintesis dan sekresi VLDL, modifikasi pada struktur LDL, dan penurunan katabolisme LDL karena penurunan reseptor LDL di hepar dan ekstrahepatik²¹.

Berat badan berlebih pada dosis 1,25 mg/kgBB diduga ikut berperan serta dalam peningkatan kadar LDL serum. Perlakuan dosis 1,25 mg/kgBB memiliki berat badan lebih tinggi jika dibandingkan dengan kelompok perlakuan lain. Perbedaan berat badan dapat mempengaruhi kadar profil lipid. Individu dengan berat badan berlebih memiliki prevelansi kadar LDL serum yang lebih tinggi^{21,22}.

Peningkatan kadar LDL serum pada pemberian minyak atsiri daun sirsak dosis 1,25 mg/kgBB juga diduga akibat peningkatan biosintesis dan sekresi VLDL. Hal ini didukung oleh peningkatan kadar kolesterol total dan trigliserida serum pada dosis 1,25 mg/kgBB (*Unpublish data*). Peningkatan kadar trigliserida dan VLDL diduga akibat peningkatan influks asam lemak yang dimobilisasi dari jaringan adiposa, peningkatan sintesis asam lemak atau dari penurunan oksidasi asam lemak²³. *Very low density lipoprotein* (VLDL) bertugas membawa lipid endogen dari hepar menuju jaringan perifer yang akan mengalami katabolisme oleh lipoprotein lipase membentuk LDL. VLDL terutama terdiri dari trigliserida dan apoprotein B100²¹.

Peningkatan kadar LDL serum pada pemberian minyak atsiri daun sirsak diduga juga diakibatkan oleh kerusakan pada struktur LDL terutama pada apoprotein B100 serta penurunan reseptor LDL di hepar dan ekstrahepatik baik karena penurunan jumlah ataupun defek struktur²². Beberapa hal tersebut dapat terjadi diduga oleh adanya kandungan minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) yaitu terpenoid, alkaloid, dan fenolik^{5,6,7}. Kandungan-kandungan tersebut sesuai dengan hasil analisa *Gas chromatography – mass spectrometry* (GC-MS) yang telah dilakukan yaitu terdapat terpenoid (81,79%), alkaloid (9,36%) dan fenolik (8,85%).

Terpenoid sebagai kandungan yang dominan pada minyak atsiri daun sirsak didukung oleh penelitian Moses *et al.* tahun 2013 dan Damayanti tahun 2016. Minyak atsiri daun sirsak mengandung 59 komponen yang beberapa diantaranya terdapat senyawa golongan terpenoid dan juga senyawa alkaloid⁴.

Minyak atsiri daun sirsak diindikasikan memiliki kandungan senyawa yang bersifat toksik berupa senyawa terpenoid, alkaloid, dan fenolik^{5,6}. Terpenoid mengalami penyerapan secara cepat dan mengakibatkan toksisitas dalam tubuh. Terpenoid mengalami metabolisme di dalam hepar melalui aktivasi enzim sitokrom P450 dan diekskresikan sebagai metabolit konjugat oleh renal. Beberapa golongan terpenoid seperti α -pinene dan limonen dapat terakumulasi dalam jaringan lipid membran sel sehingga menyebabkan kerusakan⁶. *Tymol* dan *carvacrol* dapat langsung mengakibatkan kerusakan karena keduanya langsung teroksidasi setelah masuk ke dalam darah²⁵.

Alkaloid juga mengalami metabolisme di dalam hepar dengan mengaktifasi sitokrom P450 yang akan mengakibatkan peningkatan kereaktifan senyawanya. Beberapa golongan alkaloid berpotensi merusak kerja hepar dengan meningkatkan konstentrasi Cu dan mengganggu metabolisme Fe⁷.

Salah satu golongan senyawa fenolik adalah flavonoid. Senyawa flavonoid dikenal sebagai antioksidan namun pada Rahal *et al.* tahun 2014 menyatakan flavonoid dapat bertindak sebagai prooksidan saat logam transisi tersedia misalnya Fe dan Cu. Aktivitas prooksidan flavonoid bergantung pada jumlah substitusi OH bebas pada strukturnya. Semakin banyak substitusi OH, semakin kuat aktivitas prooksidan yang ditimbulkan²⁶.

Suatu antioksidan dapat menjadi sumber radikal superoksida melalui reaksi dengan oksigen dan menjadi sumber radikal hidroksil melalui reaksi dengan ion Cu²⁺²¹. Minyak atsiri sebagai zat xenobiotik masuk ke dalam tubuh, dikonsumsi setiap hari selama 28 hari, kemudian akan mengalami metabolisme didalam tubuh. Terpenoid, alkaloid dan fenolik mengalami metabolisme di dalam hepar dan akan mengaktifasi enzim sitokrom P-450 (CYP 450). Enzim sitokrom P-450

mengkatalisis reaksi menggunakan oksigen dan NADH/NADPH sebagai kofaktor, sehingga hasil dari proses ini akan meningkatkan substrat hasil oksidatif. Apabila peningkatan radikal bebas ini terus berlanjut akan menyebabkan kondisi *stress oxidative*^{21,22,27}.

Mekanisme diatas dapat menyebabkan peningkatan kereaktifan senyawa baik terpenoid, alkaloid ataupun fenolik^{5,6,7}. Senyawa yang aktif tersebut akan beredar dalam aliran darah dan sel tubuh serta mengakibatkan kerusakan dalam tubuh. Kerusakan radikal pada asam lemak tak jenuh di membran sel dan lipoprotein plasma menyebabkan pembentukan peroksidasi lipid dan terjadi modifikasi kimia protein atau lipid pada struktur LDL terutama apoprotein B100 sehingga menghasilkan LDL abnormal. *Low density lipoprotein* tersebut tidak mampu berikatan dengan reseptornya sehingga *clearance* LDL pun terganggu dan terjadi peningkatan LDL dalam plasma. Kerusakan ini juga dapat terjadi pada reseptor LDL hepar dan ekstrahepatik sehingga mengganggu katabolisme LDL²².

Penelitian ini menunjukkan bahwa antar perlakuan terjadi penurunan kadar LDL dengan peningkatan dosis. Kelompok jantan perlakuan dosis 1,25 mg/kgBB menunjukkan kadar LDL serum lebih tinggi dibandingkan perlakuan dosis 2,5 dan 5 mg/kgBB. Antar perlakuan pada kelompok betina tidak menunjukkan adanya perbedaan, namun kadar LDL cenderung menurun dengan peningkatan dosis. Hal ini dapat dihubungkan dengan peningkatan kadar HDL serum pada dosis tersebut²¹. Tingginya kadar apoprotein A1 pada HDL dapat menekan peningkatan kadar LDL serum²⁸. Penelitian Warditiani *et al.* tahun 2016 dan Darni *et al.* tahun 2016 menyebutkan bahwa flavonoid dan terpenoid pada daun sirsak dapat menurunkan kadar kolesterol dengan cara menghambat enzim 3-hidroksil-3 metilglutaril (HMG-KoA) reduktase.

Penurunan kadar LDL serum dengan peningkatan dosis diduga akibat peran serta nilai berat badan dan konsumsi makan hewan coba^{21,22}. Penelitian menunjukkan bahwa semakin tinggi dosis perlakuan, berat badan akhir dan konsumsi makan hewan coba semakin menurun. Penurunan konsumsi makan didukung dari data sisa makanan pada kelompok jantan dan betina perlakuan dosis 5 mg/kgBB lebih besar dibandingkan dengan kelompok lainnya, yaitu berturut-turut sebesar 8.04 gram dan 9.13 gram dari 30 gram per hari. Berat badan pada kelompok jantan dan betina perlakuan dosis 5 mg/kgBB menunjukkan nilai yang rendah dibandingkan kelompok perlakuan lain, yaitu berturut-turut sebesar 174 gram dan 145 gram. Individu dengan berat badan dan konsumsi makan yang kurang cenderung memiliki nilai profil lipid yang lebih rendah²¹.

Hasil penelitian antara kelompok jantan dan betina menunjukkan adanya kecenderungan perbedaan nilai kadar LDL. Hal ini dapat diakibatkan oleh perbedaan nilai berat badan dan konsumsi makan, dimana kelompok jantan memiliki berat badan dan konsumsi makan lebih besar dibandingkan kelompok betina²¹. Hormon estrogen pada kelompok betina diduga ikut mempengaruhi nilai kadar LDL serum. Estrogen berperan dalam menurunkan kadar LDL dengan cara meningkatkan ekspresi reseptor LDL hepar sehingga meningkatkan *clearance* LDL³². 17- β estradiol di dalam hepar dapat mengurangi sintesis apoprotein B100, yang merupakan komponen LDL. Estrogen dalam hepatosit merangsang sintesis apoprotein C-III yang menghambat hidrolisis oleh lipoprotein lipase, sementara menurunkan sintesis hepatik lipase³³. Estrogen juga dapat meningkatkan ekspresi gen apoprotein dan reseptor LDL hepatik serta menurunkan transkripsi gen lipoprotein lipase melalui ER α ³⁴.

Pengaruh Pemberian secara Subkronik Minyak Atsiri Daun Sirsak (*Annona muricata* Linn.) terhadap Kadar *High Density Lipoprotein* (HDL) Serum Tikus Wistar

Pemberian minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) pada kelompok jantan menunjukkan bahwa kelompok kontrol negatif memiliki kadar HDL serum lebih rendah secara signifikan dibandingkan kelompok perlakuan dosis 2,5 mg/kgBB serta antar perlakuan menunjukkan bahwa dosis 2,5 mg/kgBB merupakan dosis tertinggi yang mengakibatkan peningkatan kadar HDL serum. Hal yang sama juga terjadi pada kelompok betina. Kelompok perlakuan dosis 2,5 mg/kgBB mengalami peningkatan kadar HDL serum lebih tinggi dibandingkan dosis perlakuan lainnya. Semua kelompok kontrol negatif dan perlakuan tampak bahwa kadar HDL serum dalam batas normal HDL tikus wistar, yaitu ≥ 35 mg/dl³⁵.

Peningkatan kadar HDL akibat pemberian minyak atsiri daun sirsak pada kelompok perlakuan dosis 1,25 mg/kgBB dan 2,5 mg/kgBB menunjukkan bahwa dosis tersebut merupakan rentang dosis terapi. Senyawa terpenoid dalam minyak atsiri daun sirsak diduga meningkatkan aktivitas enzim *Lecithin Cholesterol Acyltransferase* (LCAT). LCAT merupakan enzim plasma yang mengubah kolesterol bebas menjadi kolesterol ester, kemudian memasukkan kolesterol ester tersebut ke dalam inti partikel lipoprotein membentuk HDL matang yang sferis³⁶. Efek antioksidan dalam minyak atsiri dapat meningkatkan kadar HDL dengan cara meningkatkan mRNA Apoprotein A1 hepar yang menginisiasi sintesis Apoprotein A1³⁰.

Keadaan lain terjadi pada kelompok perlakuan jantan dan betina dosis 5 mg/kgBB yang menunjukkan kadar HDL lebih rendah secara

signifikan dibandingkan kelompok perlakuan dosis 2,5 mg/kgBB. Penurunan kadar HDL dapat terjadi akibat beberapa hal, yaitu akibat kerusakan pada hepar sehingga terjadi penurunan fungsi pembentukan apoprotein A1, defek struktur apoprotein A1, penurunan protein ABCA1 atau karena penurunan fungsi enzim *Lecithin Cholesterol Acyltransferase* (LCAT)²¹.

Mekanisme diatas diduga akibat efek toksik senyawa terpenoid, alkaloid, dan fenolik. Terpenoid, alkaloid, dan fenolik berfungsi sebagai antioksidan dan antiinflamasi dalam dosis yang tepat. Apabila dosis penggunaan tinggi dan dalam waktu yang lama maka akan berubah menjadi prooksidan yang bersifat toksik^{5,6,7}.

Terpenoid dan alkaloid disebut sebagai sitotoksin karena keduanya dapat mengganggu fungsi seluler. Biomembran merupakan target penting yang akan mengalami kerusakan. Target berikutnya di dalam sel mencakup enzim, protein, DNA, RNA dan proses yang terkait³⁷.

Beberapa golongan terpenoid seperti sinamaldehyd dan eugenol adalah yang paling banyak terbukti bersifat toksik dengan menghambat metabolisme energi pada sel sehingga sel tidak mampu melakukan metabolisme⁶. Hal ini didukung oleh Wink tahun 2009 yang menyatakan terpenoid aktif dapat menghambat transporter ADP/ATP mitokondria sehingga suplai ATP sel berkurang. Penelitian lain membuktikan α -pinene dan limonen terakumulasi dalam jaringan lipid membran sel sehingga dapat menyebabkan kerusakan pada sel tersebut⁶.

Aktivitas molekular pada alkaloid berhubungan dengan *cross link* rantai DNA dan juga unit DNA dengan nukleoprotein. Perubahan molekular oleh alkaloid diduga menciptakan efek sitotoksik, anti mitosis dan efek megalositosis pada sel³⁸. Beberapa golongan alkaloid berpotensi merusak kerja hepar karena mampu meningkatkan konsterasi Cu dan mengganggu metabolisme Fe⁷. Alkaloid juga dapat menyebabkan gangguan respirasi seluler dengan mengikat ion besi dari sitokrom oksidase terminal dalam rantai respirasi mitokondria³⁷.

Flavonoid telah ditemukan mampu menimbulkan efek mutagenik in vitro. Flavonoid yang bersifat prooksidan mampu menginduksi kerusakan inti DNA dan mengakibatkan peroksidasi lipid dengan adanya logam transisi²⁶.

Minyak atsiri sebagai zat xenobiotik masuk ke dalam tubuh, dikonsumsi setiap hari selama 28 hari akan mengalami metabolisme di dalam hepar. Senyawa terpenoid, alkaloid dan fenolik mengalami metabolisme fase 1 dimana akan mengaktivasi enzim sitokrom P-450 sehingga hasil dari proses ini akan menambah kereaktifan senyawa. Kereaktifan

dari ketiga senyawa tersebut dapat mengakibatkan peroksidasi lipid yang akhirnya menyebabkan kerusakan berbagai sel dalam tubuh^{5,6,21}. Target utama kerusakan senyawa terpenoid, alkaloid dan fenolik adalah organ hepar^{6,38}.

Dugaan terjadi kerusakan hepar pada pemberian minyak atsiri daun sirsak dosis 5 mg/kgBB didukung oleh peningkatan kadar malondialdehida (MDA) hepar serta peningkatan jumlah nekrosis sel hepatosit pada dosis 5 mg/kgBB (*Unpublish data*). Malondialdehida merupakan produk akhir peroksidasi lipid dan merupakan ukuran terjadinya stres oksidatif pada sel²⁶. Penelitian lain menunjukkan terjadi peningkatan kadar SGOT dan SGPT serum pada dosis 5 mg/kgBB baik jantan dan betina, yang keduanya merupakan enzim penanda kerusakan hepar (*Unpublish data*).

Kerusakan hepar dapat menyebabkan penurunan sintesis apoprotein A1. Apoprotein A1 memediasi langkah awal pembentukan HDL, lipidasi oleh ABCA1, dan kofaktor aktivasi enzim LCAT. Modifikasi struktural apoprotein A1 mempengaruhi struktur protein apoprotein A1, yang sering menyebabkan gangguan fungsi dan / atau peningkatan katabolisme³¹. Penurunan jumlah dan fungsi Apoprotein A1 sebagai kofaktor enzim *Lecithin Cholesterol Acyltransferase* (LCAT) mengakibatkan esterifikasi kolesterol bebas menjadi kolesterol ester terganggu. Hal ini mengakibatkan penurunan pembentukan HDL serum dan akumulasi kolesterol bebas pada lipoprotein dan jaringan perifer²².

Penurunan HDL dapat juga disebabkan oleh gangguan protein ABCA1. Protein ABCA1 hepatik adalah kunci untuk mengedarkan HDL. Meskipun ABCA1 ekstrahepatik juga penting untuk pematangan partikel HDL, namun sedikit berkontribusi pada kadar HDL plasma³⁹. Apabila protein ABCA1 mengalami kerusakan maka akan menghasilkan aktivitas ABCA1 seluler yang rendah atau tidak terdeteksi. Kadar apoprotein A1 yang terbentuk pun juga sangat rendah karena katabolisme cepat apoprotein akibat rendahnya kadar lipid³¹.

Hasil penelitian antara kelompok jantan dan betina menunjukkan adanya kecenderungan perbedaan nilai kadar HDL. Kadar HDL pada kelompok jantan cenderung lebih rendah dibandingkan kelompok betina. Hal ini diduga oleh adanya pengaruh hormon estrogen pada kelompok betina yang dapat meningkatkan kolesterol HDL (terutama subfraksi HDL₂). Peningkatan kadar HDL disebabkan karena estrogen mampu meningkatkan produksi apoprotein A-1 dan menurunkan aktivitas hepatik lipase³². Estrogen juga mampu meningkatkan ekspresi gen *ATP binding cassette A1* (ABCA1)⁴⁰.

Mekanisme pasti bagaimana kandungan minyak atsiri daun sirsak dalam meningkatkan kadar LDL dan menurunkan kadar HDL serum belum diketahui. Pemeriksaan melibatkan penilaian biokimia dan genetika tambahan, misalnya pemeriksaan struktur LDL dan reseptor LDL pada hepar maupun ekstrahepatik perlu dilakukan untuk mengetahui penyebab utama peningkatan kadar LDL serum, sedangkan untuk mengetahui penyebab utama penurunan kadar HDL serum perlu dilakukan juga pemeriksaan kadar apoprotein A-1 plasma, kolesterol bebas plasma (tidak teresterifikasi), aktivitas enzim LCAT, dan komponen fraksi HDL.

Perbedaan nilai kadar LDL dan HDL serum antara kelompok jantan dan betina tidak dilakukan analisa lebih lanjut, karena tidak memenuhi syarat uji *Independent t-test* ($n < 6$ sampel)⁴¹. Oleh karena itu, untuk mengetahui perbedaan nilai kadar LDL dan HDL serum antara kelompok jantan dan betina secara pasti perlu dilakukan penambahan sampel.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil analisa data dan pembahasan dalam penelitian ini, peneliti mengasumsikan bahwa minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) dosis 2,5 mg/kgBB merupakan dosis aman yang tidak meningkatkan kadar LDL serum dan menurunkan kadar HDL serum secara subkronik, baik pada tikus normal jantan dan betina.

SARAN

Berdasarkan hasil penelitian yang telah dilakukan, guna peningkatan dan pengembangan lebih lanjut peneliti menyarankan :

1. Penelitian pemberian minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) secara kronik dengan dosis yang sama diperlukan untuk mengetahui keamanan penggunaan minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) dalam jangka waktu yang lebih lama.
2. Penelitian lebih lanjut mengenai farmakodinamik minyak atsiri daun sirsak (*Annona muricata* Linn.) terutama terpenoid dalam proses meningkatkan LDL dan menurunkan HDL perlu dilakukan.
3. Penambahan sampel penelitian diperlukan untuk dapat melakukan uji *Independent t-test* sehingga dapat mengetahui secara pasti perbedaan kadar LDL dan HDL serum antara kelompok jantan dan betina.

DAFTAR PUSTAKA

1. World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023, 43, WHO Press. Geneva. 2013.
2. Dayeef, Azim Y.M., Setyawati, K., and Sujuti, H. The Influence Of *Annona muricata* Leaves Extract In Damaging Kidney Cell And Inducing Caspase-9 Activity. *IOSR Journal of Pharmacy and Biological Sciences (IOSR-JPBS)*. (November - Desember 2013). Vol. 8, Issue 5; pp : 48-52.
3. Moses, S. Owolabi, Akintayo Lanre Ogundajo, Noura S. Dosoky, and William N. Setzer. The cytotoxic activity of *Annona muricata* leaf oil from Badagary, Nigeria. *American Journal of Essential Oils and Natural Product*. 2013. Volume 1(1) : 1-3.
4. Sawant, T.P and Dongre, R.S. Bio-Chemical Compositional Analysis Of *Annona muricata*: A Miracle Fruit's Review. *International Journal of Universal Pharmacy and Bio Sciences*. 2014. Volume 3 (2); pp 82-104.
5. Juliani, R., Yuharmen, Teruna, H.Y. Identifikasi dan Uji Toksisitas Ekstrak Metanol dari Daun Tanaman Sirsak (*Annona muricata* L.). *Jurnal Online Mahasiswa (JOM) Bidang Matematika dan Ilmu Pengetahuan Alam*. 2014. Volume 1 (1); pp 1-6.
6. Kashani, J.S. 2015. *Terpene Toxicity*. Download dari <http://www.emedicine.medscape.com/article/818675-overview> diakses pada 28 Mei 2017.
7. Kardinasari, E. Profil Lipid Peroksida Tikus Sprague Dawley Hiperglikemia yang Diberi Ekstrak Daun Wungu (*Graptophyllum pictum* L. Griff), Skripsi. Institut Pertanian Bogor. 2014.
8. Arthur, F.K.N., Woode, E., Terlabi, E.O., and Larbie, C. Evaluation of acute and subchronic toxicity of *Annona muricata* (Linn.) aqueous extract in animals. *Pelagia Research Library European Journal of Experimental Biology*. 2011. Volume 1 (4); 115-124.
9. Subekti, N.K. Uji Toksisitas Akut Ekstrak Metanol Daun Laban Abang (*Aglalia elliptica* BLUME) terhadap Larva Udang (*Artemia salina* LEACH) dengan Metode Brine Shrimp Lethality Test (BSLT), Skripsi. Fakultas Kedokteran dan Ilmu Kesehatan Universitas Islam Negeri Syarif Hidayatullah. Jakarta. 2014.
10. Horiba-Medical. ABX Pentra C200; *Automatic Biochemistry Analyzer/Compact*. Motpellier. France. 2012. Nomor serial 2080116012.
11. BioSystem S.A. Reagents Instruments. Costa Brava. *Cholesterol HDL Precipitating Reagent*. Barcelona (Spain). 2016. Nomor serial 801756285; versi 1.4.
12. Damayanti, D.S., Athiroh, N., dan Aini, N. Pengaruh Ekstrak *Pueraria lobata* var. Kangen terhadap Kadar MDA, Reseptor α -1 Adrenergik, Profil lipid, dan Remodeling Sel Otot Polos Aorta Tikus Hipoestrogen. Publikasi, PPD UNISMA. Malang. 2007.
13. Udin, M.F. Pengaruh Pemberian Vaksin LDL-yang Dioksidasi Kombinasi dengan Adjuvan TT Terhadap Imunoglobulin-G Arteri Renalis, Tesis, Program Studi Biomedik Kekhususan Immunologi Universitas Brawijaya. Malang. 2005.
14. BPOM. *Pedoman Uji Toksisitas Nonklinik secara in vivo*. Jakarta. BPOM. 2014.

15. Hairrudin. Pengaruh Pemberian Ekstrak Jinten Hitam Dalam Mencegah Stres Oksidatif Akibat Latihan Olahraga Anaerobik. *Jurnal Biomedis* III. 2005 (1) : 1-11.
16. Yanuwar, N.C.E. *Efek Minyak Atsiri Daun Sirsak (Annona muricata Linn.) terhadap Kadar SGOT dan SGPT Serum Tikus Wistar Jantan yang Diinduksi Rifampisin*, Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. 2016.
17. Tadros, T.F. *Emulsion Formation, Stability, and Rheology*: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. Weinheim, Germany. 2013.
18. Triliana, R. *Pengaruh Terapi Suplementasi Sterol Tanaman (Fitosterol) Pada Profil Lemak, Kadar Apolipoprotein (Apo) B-48, Dan Penghitungan Sel Busa Aorta Tikus Pasca Diet Aterogenik*, Tesis, Magister Kesehatan Universitas Brawijaya. Malang. 2005.
19. Ali, B., Al-Wabel, N.A., Shams, S., Ahamad, A., Khan, S.A., and Anwar, F. Essential Oils Used in Aromatherapy : A Systemic Review. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. August 2015; Vol. 5, Issue 8; pp : 601-611.
20. Warnick, G.R., Nauck, M., Rifai, N. Methods for measurement of LDL-cholesterol: a critical assessment of direct measurement by homogeneous assays versus calculation. *Clin Chem*. 2001b. Feb; 48 (2): 236-54.
21. Murray, R.K., Bender, D.A., Botham, K. M., Kennelly, P.I., Rodwell, V.W., and Weil, P.A. *Harper's Illustrated Biochemistry*, 30th Ed. Jakarta: The McGraw-Hill Education (Asia) and EGC Medica Publisher. 2015. Chapter 25, pp.250-260.
22. Kumar, V., Abbas, A.K., Aster, J.C. *Robbins Basic Pathology*, ninth edition. Elsevier saunders. 2013. Chapter 1, pp. 11-40.
23. Widya, N.P. *Aktivitas Spesifik Katalase Jaringan Hati Tikus yang Diinduksi Hipoksia Hipobarik Akut Berulang*. Skripsi. Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia. Jakarta. 2009.
24. Damayanti, D.S. Potensi *Annona muricata* Linn. sebagai Antioksidan melalui Penghambatan DPPH secara Invitro dan Efek *Annona muricata* Linn. terhadap Peningkatan HSP₇₀ Hepar Tikus yang Diinduksi Rifampisin dan Minyak Jagung. *Laporan Penelitian Dosen*. Fakultas Kedokteran Universitas Islam Malang. 2016.
25. Kohlert, C., Rensen, V., Marz, R., Schindler, G., Graefe, E.U., and Veit, M. Bioavailability and Pharmacokinetics of Natural Volatile Terpenes in Animals and Humans. Review. Germany. *Planta Med*. 2000; Vol. 66(1) : 495-505.
26. Rahal, A., et al., Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants : The Interplay. Review Article. *BioMed Research International*. 2014. Volume 2014.
27. Lobo, V., Patil, A., and Chandra, N. *Free radicals, antioxidants and functional food: Impact on human health*. *Pharmacogn Rev*. Jul-Dec 2010; Vol. 4 (8): 118-126.
28. Asgary, S., Moshtaghian, J., Hosseini, M., Naderi. Effects of Alfalfa on lipoproteins and fatty streak formation in hypercholesterolemic rabbits. *Pak J Pharm Sci*; 2008. 21 (4): 460-464.
29. Warditiani, N.K et al. Pengaruh Pemberian Fraksi Terpenoid Daun Katuk (*Sauropus Androgynus* (L.) Merr) terhadap Profil Lipid Tikus Putih (*Rattus Novvergicus*, L.) Jantan Galur Wistar yang Diinduksi Pakan Kaya Lemak. *Jurnal Gizi Klinik Indonesia*. Oktober 2016. Vol. 13 (2): 66-71.
30. Darni, J., Tjahjono, K., Sofro, M.A.U. Effect of Alfalfa (*Medicago sativa*) leaf extract on lipid profile and malondialdehyde level hypercholesterolemia rats. *The Indonesian Journal of Clinical Nutrition*. Oktober 2016. Vol 13, No.2; pp : 51-58.
31. Rader, D.J and deGoma, E.M. Approach to the Patient with Extremely Low HDL-Cholesterol. *Journal of Clinical Endocrinology Metabolism*. 2012. Vol. 97 (10) : 3399-3407.
32. Darabi, M., Rabbani, M., Ani, M., Zarean, E., Panjehpour, M., and Movahedian, A. Increased leukocyte ABC1A1 gene expression in post-menopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecological Endocrinology*. 2011. Vol. 3 (1) : 446-455.
33. Szafran, H and Smielak-Korombel, W. The Role of Estrogen in Hormon Regulation of Lipid Metabolism in Women. *National Centre for Biotechnology Information*. 2008. Vol. 55 (5): 266-70.
34. Villa, P., Moruzzi, M.C., Lassandro, A.P., Lanzone, A., and Mancuso, S. Metabolic Impact of Estrogen Replacement Therapy. *Journal of Reproductive Medicine and Endocrinology*. 2010. Vol.7 (Sonderheft 1): 119-124.
35. Warnick, G.R., Nauck, M., Rifai, N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. *Clin Chem*. 2001a. Sep; 47 (9): 1579-96.
36. Djellouli, F., D. Kroufi, M. Bouchenak, M.A.L. Dubois. Favorable Effects of Globularia alypum L. Lyophilized Methanolic Extract on the Reverse Cholesterol Transport and Lipoprotein Peroxidation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 2014. Vol.6 (4) :758-765.
37. Wink, M. Mode of Action and Toxicology of Plant Toxins and Poisonous Plants. Heidelberg University, Institute of Pharmacy and Molecular Biotechnology, Germany. *Mitt, Julius Kuhn-Inst*. 421. 2009.
38. Bildfell, R. Overview of Pyrirolizidine Alkaloidosis. MSD. *Veterinary Manual*. 2016.
39. Wang, H and Peng, Dao-Quan. New insights into the mechanism of low high-density lipoprotein cholesterol in obesity. *Lipid in Health and Disease*. BioMed Central. 2011, Vol.10 : 176.
40. Hamden, K., Jaouadi, B., Zarai, N., Rebai, T., Carreau, S., and Elfeki, A. Inhibitory effects of estrogen on digestive enzyme, insulin deficiency, and pancreas toxicity in diabetic rats. *Journal of Physiology and Biochemistry*; 2011. Vol. 67 (1) : 121-128.
41. SPSS Tutorials : Independent Samples T Test. Kent State University. 2017. Download dari <http://libguides.library.kent.edu/SPPSS/IndependentTTest> diakses pada 17 Juni 2017.